



TITLE:

Studies on breeding of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for effective macroalgae utilization based on the metabolism of marine bacterium(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takagi, Toshiyuki

CITATION:

Takagi, Toshiyuki. Studies on breeding of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for effective macroalgae utilization based on the metabolism of marine bacterium. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20440>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-06-20に公開; 許諾条件により要約は2018-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	高木 俊幸
論文題目	Studies on breeding of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for effective macroalgae utilization based on the metabolism of marine bacterium (海洋細菌の代謝を基盤とした大型藻類有効利用のための酵母育種の研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>広大な排他的経済水域を持つ日本において、大型に成長する海藻は非常に有望なバイオマス資源である。海藻はほとんど未利用であり、陸上植物に特有な難分解性リグニンを含まないため簡単な処理で多糖成分を抽出できる。しかし、海藻は陸上植物と多糖構成が異なるため、既存技術に基づく手法ではエタノールへの変換効率が低い。特に、アルギン酸は褐藻の乾燥重量の40%を占める主要多糖であるが、海洋細菌による資化機構すらほとんどわかっていない。</p> <p>本研究では、海藻資化能が極めて高い海洋細菌 <i>Saccharophagus degradans</i> に注目して、そのゲノム情報を基にしたオミックス解析からアルギン酸資化機構の解明を行った。さらに、アルギン酸のエタノールへの変換技術開発を目的として、アルギン酸資化の情報を基にして合成生物学的なアルギン酸資化酵母の分子育種を行った。</p>			
1. 海洋細菌 <i>S. degradans</i> のアルギン酸資化機構の解明			
<p>アルギン酸、グルコース、ペクチン存在下で培養した <i>S. degradans</i> の全タンパク質をペプチド断片化後、モノリスキャピラリーカラムと組み合わせた nanoLC-MS/MS によって比較プロテオーム解析を行った。これにより、全ての基質で発現している 987 個のタンパク質の同定に成功した。さらに、統計解析によって、<i>S. degradans</i> がアルギン酸分解時に特異的に生産している 23 個のタンパク質を選抜した。それらのタンパク質をコードする遺伝子のゲノム上の位置を調べた結果、アルギン酸分解代謝に特異的に生産されているアルギン酸リアーゼ、トランスポーター、代謝酵素群をコードする遺伝子群が局在しているクラスターを発見した。アルギン酸をオリゴ糖や単糖 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (単糖 DEH) への分解を触媒するアルギン酸リアーゼ群の中でも、細胞外分泌シグナル配列を持つ Alg6F (Sde_2873)、Alg17C (Sde_3284)、Alg6B (Sde_3285) と細胞外膜に局在すると考えられている Lipobox を含むシグナル配列を持つ Alg7E (Sde_2478)、Alg7K (Sde_2839)、Alg6I (Sde_3274)、Alg6H (Sde_3275) の特異的な生産を見出した。この結果は、これまでに生化学的な知見の少ない細胞外膜局在型のアルギン酸リアーゼも、アルギン酸資化において重要であることを示している。また、細胞外膜に存在する TonB-dependent receptors (Sde_1508、Sde_1386、Sde_2991) と細胞内膜に存在する Major facilitator superfamily transporter (Sde_3282) がアルギン酸分解時に特異的に生産されており、<i>S. degradans</i> は、これらのトランスポーターによってアルギン酸分解物を細胞内に取り込んでいると推測した。</p> <p>さらに、アルギン酸分解代謝に特異的なクラスター上に、アノテーションされていない遺伝子 <i>Sde_3281</i> を見出したが、これは単糖 DEH 代謝酵素 (DehR) をコードする遺伝子ではないかと推定した。大腸菌で <i>Sde_3281</i> 発現系を構築後、NADPH 存在下で単糖 DEH と反応させたところ、DehR 活性特異的な吸光度 340 nm の減少を示したことから、この遺伝子が DehR をコードすることを初めて明らかにした。単糖 DEH は、この DehR によって 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG) に変換され、</p>			

さらに KDG kinase (KdgK) と 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase (KdgpA) による反応でピルビン酸へ代謝されることが推定された。*S. degradans* は KdgK をコードする四つの遺伝子を持つことがゲノム解析によりわかっているが、アルギン酸由来の KDG を代謝する際には、Sde_3280 を発現していることも明らかにした。また、*S. degradans* は KdgpA をコードする遺伝子 Sde_1382 持つことがゲノム解析から判明したので、単糖 DEH は、Sde_3281 (DehR)、Sde_3280 (KdgK)、Sde_1382 (KdgpA) の酵素によってピルビン酸まで代謝されていることが明らかになった。

2. アルギン酸分解と有用単糖 DEH 生産のための酵母生体触媒の構築

酵母によるアルギン酸からのエタノール発酵を行うためには、アルギン酸分解能を酵母に付与する必要がある。そこで、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるアルギン酸リアーゼの異種発現系の構築を試みた。

S. degradans 由来のアルギン酸リアーゼを、開発した細胞表層工学技術によって酵母 *S. cerevisiae* の細胞壁アンカータンパク質である α -アグルチニンと融合して発現させて、酵母細胞表層に提示した。蛍光抗体染色によりアルギン酸リアーゼの提示を確認後、DNS アッセイによる還元糖の定量や薄層クロマトグラフィーによる糖の分離検出によって、細胞生体触媒のアルギン酸分解活性を検出した。Alg7A、Alg7D、Alg18J 提示酵母は、アルギン酸をオリゴ糖に分解するエンド型アルギン酸リアーゼ活性を示した。一方、Alg7K 提示酵母は、オリゴ糖を単糖 DEH まで分解するエキソ型アルギン酸リアーゼ活性を示した。また、アルギン酸標品からポリグルロン酸画分とポリマンヌロン酸画分を調製し、提示したアルギン酸リアーゼの基質特異性を明らかにした。

さらに、効率的にアルギン酸を分解するためにエンド型/エキソ型アルギン酸リアーゼ共提示酵母を構築した。共提示酵母は、いずれも単独でアルギン酸リアーゼを提示した酵母よりもより高いアルギン酸分解活性の上昇を示した。Alg7K/7A 共提示酵母が最も高い活性を示し、1時間あたり1.98 g/L (36.8%のアルギン酸を分解) の還元糖生産を達成した。

3. アルギン酸からのエタノール発酵のための酵母の合成生物学的育種

酵母によりアルギン酸から直接エタノール発酵を行うために、上記のエンド/エキソ型アルギン酸リアーゼ共提示酵母に単糖 DEH の人工代謝経路を構成する酵素をコードする遺伝子群を導入した。*Asteromyces cruciatus* 由来 *DEH transporter* 遺伝子、*Vibrio harveyi* 由来 *DehR* 遺伝子、*Escherichia coli* 由来 *KdgK* 遺伝子、*V. splendidus* 由来 *KdgpA* 遺伝子のコドン酵母に最適化した後、ゲノムに導入しアルギン酸資化酵母を作出した。このアルギン酸資化酵母をアルギン酸培地で継代培養したところ、アルギン酸資化能を増強した Alg1 株の育種に成功した。さらに細胞内のレドックスバランスを調整するために、Alg1 株にマンニトール資化能を付与した。本株により、最大で4.8g/Lのエタノール生産を達成した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

日本のエネルギー安全保障のため、大型藻類の有効利用は、広大な排他的経済水域を生かす画期的な方策である。ただ、特に、これまで大型褐藻の主要多糖であるアルギン酸は利用方法が確立されていなかった。本研究では、海洋細菌の比較プロテオーム解析と酵母の合成生物学的な育種によって、アルギン酸資化機構解明とエタノール発酵技術の構築を試みた。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. アルギン酸、グルコース、ペクチン存在下で培養した *S. degradans* の全タンパク質を比較プロテオーム解析することで、アルギン酸を資化する際に特異的に生産されている 23 種類のタンパク質を選抜した。それらのタンパク質のゲノム上の位置を調べることで、アルギン酸資化時に特異的に生産されているタンパク質をコードする遺伝子群が局在する遺伝子クラスターを発見した。さらに、タンパク質の局在予測や大腸菌による異種タンパク質発現系の構築によって、*S. degradans* のアルギン酸資化機構の全容を初めて明らかにした。
2. *S. degradans* 由来のアルギン酸リアーゼを酵母の細胞壁タンパク質である α -アグルチニンと融合することで、酵母細胞表層へ提示した。Alg7K 提示酵母は、細胞表層上でエキソ型アルギン酸リアーゼ活性を示した。さらに、より効率的にアルギン酸を分解するためにエンド型とエキソ型アルギン酸リアーゼを共提示した系を構築し、単糖 DEH 生産の効率化を世界で初めて達成した。
3. アルギン酸リアーゼ共提示酵母に単糖 DEH のトランスポーターと人工代謝経路を導入することで、アルギン酸資化酵母を構築した。さらに、マンニトール資化能を付与することで、レドックスバランスの調整を行い、アルギン酸から直接的にエタノールを発酵生産することに成功した。

以上のように、本論文は、これまで未知であった海洋細菌のアルギン酸資化機構を解明し、それらの情報を基にアルギン酸資化能を有する酵母の合成生物学的な育種を行った。これによりアルギン酸からの単糖 DEH とエタノールの生産系の構築に成功した。これらの結果は、生体高分子化学、バイオマス利用学、海洋生態学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）